



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

**DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE  
SEZIONE DI FISIOPATOLOGIA MEDICA ED  
ENDOCRINOLOGIA**

**DOTTORATO DI RICERCA**

**SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE  
Biotecnologie della Riproduzione Umana  
XXXI ciclo**

**“ASPETTI MOLECOLARI DELLA SINDROME DI KLINEFELTER:  
STUDIO DELLE MICRODELEZIONI DEL CROMOSOMA Y E  
POLIMORFISMI DEL RECETTORE DEGLI ANDROGENI”**

**Relatore:**

Prof.ssa Donatella Paoli

**Candidata:**

Dott.ssa Francesca Sciarra

**Anno Accademico 2017-2018**

## INDICE

<b>1- INTRODUZIONE</b>	pag 1
<b>2- STUDIO 1 - Valutazione dell'incidenza delle microdelezioni in pazienti Klinefelter</b>	pag 5
<b>3- MATERIALI E METODI</b>	pag 5
<b>3.1- Pazienti</b>	pag 5
<b>3.2- Analisi seminale</b>	pag 5
<b>3.3- Biopsia testicolare</b>	pag 5
<b>3.4- Screening delle microdelezioni cromosoma Y</b>	pag 6
<b>4- RISULTATI</b>	pag 6
<b>4.1- Analisi seminale</b>	pag 6
<b>4.2- Analisi delle microdelezioni nei NOA</b>	pag 7
<b>4.3- Analisi delle microdelezioni in KS</b>	pag 8
<b>5- DISCUSSIONE</b>	pag 8
<b>6- STUDIO 2- Valutazione dei CAG repeats in pazienti Klinefelter</b>	pag 15
<b>7- MATERIALI E METODI</b>	pag 15
<b>7.1- Pazienti</b>	pag 15
<b>7.2- Analisi seminale</b>	pag 15
<b>7.3- Estrazione del DNA genomico</b>	pag 15
<b>7.4- Amplificazione PCR per valutare il numero dei CAG repeats</b>	pag 15
<b>7.5- Valutazione della percentuale di inattivazione dei due alleli sul cromosoma X</b>	pag 16

7.6- Sequenziamento con analisi di frammenti	pag 16
7.7- Analisi dell'inattivazione del cromosoma X	pag 16
7.8- Analisi statistica	pag 17
<b>8- RISULTATI</b>	pag 18
8.1- Studio dei CAG repeats	pag 18
8.2- Studio dell'inattivazione del cromosoma X	pag 19
<b>9- DISCUSSIONE</b>	pag 21
<b>10- CONCLUSIONI</b>	pag 27
<b>11- BIBLIOGRAFIA</b>	pag 28

## 1. INTRODUZIONE

La sindrome di Klinefelter descritta per la prima volta nel 1942 da Harry F. Klinefelter, è una malattia genetica, che colpisce gli individui di sesso maschile, caratterizzata da alta statura, proporzioni del corpo eunucoide, incompleto sviluppo dei caratteri sessuali maschili primari e secondari, ginecomastia, testicoli dalle dimensioni ridotte, azoospermia ed aumento dei livelli ormonali di FSH. La sindrome è causata da un'aneuploidia congenita dei cromosomi sessuali e nell'80% i pazienti presentano il cariotipo 47, XXY mentre i restanti casi hanno un più alto grado di aneuploidie, mosaicismo o strutture anormali del cromosoma X (Lanfranco et al., 2004). La prevalenza della sindrome di Klinefelter (KS) è compresa tra 1/500 e 1/1000 e viene considerata la principale causa genetica di infertilità maschile (Bojesen et al., 2003), responsabile del 10-15% delle oligospermie severe e azoospermie non ostruttive. Nei soggetti KS si verifica, infatti, la degenerazione dei tubuli seminiferi che inizia prima della pubertà e porta, nella maggior parte dei casi, alla completa ialinizzazione dei tubuli seminiferi nell'adulto, anche se in alcuni soggetti KS adulti possono essere presenti alcuni tubuli funzionali (Aksglaede et al 2006). Sebbene la maggioranza dei soggetti KS siano azoospermici e quindi sterili, sono stati descritti, in letteratura casi di oligozoospermia severa e criptozoospermia in pazienti di età inferiore ai 24 anni (Forti et al, 2006).

Diversamente dalle trisomie autosomiche che hanno un'origine paterna soltanto nel 10% dei casi, il cromosoma X soprannumerario dei pazienti KS origina nel 50% dei casi da una non disgiunzione paterna (Thomas and Hassold, 2003). L' XXY di origine materna può essere causato da una non-disgiunzione durante la prima e la seconda divisione meiotica oppure durante le divisioni mitotiche precoci post zigotiche mentre si verifica lo sviluppo dello zigote. L' XXY paterno invece, origina soltanto da errori durante la meiosi I; la non disgiunzione paterna durante la meiosi II porterebbe infatti alla formazione di zigoti XXX e XYY (Lanfranco et al, 2004) La grande maggioranza dei casi Klinefelter con origine paterna deriva quindi da eventi di non disgiunzione durante la meiosi I, anche se sono stati descritti casi di separazione prematura dei cromatidi fratelli durante la meiosi I. (Tüttelmann et al 2010)

E' stato ipotizzato che le delezioni e i riarrangiamenti del cromosoma Y potessero avere un ruolo nel mancato appaiamento dei cromosomi e indurre una maggiore frequenza

degli eventi di non disgiunzione (Rajpert et al.,2011). In accordo con questa ipotesi è stato dimostrato che la microdelezione della regione AZFc (b2/b4) è associata con elevata percentuale di spermatozoi nullisomici e con disomia XY e conseguente rischio dopo ICSI della nascita di bambini 47XXY (Ferlin et al.,2007).

Le microdelezioni del cromosoma Y rappresentano la causa genetica più frequente di infertilità maschile, con una prevalenza del 10-15% tra i soggetti affetti da azoospermia non ostruttiva o grave oligozoospermia (<5mil sperm/ml) (Foresta *et al.*, 2001). Molto raramente si riscontrano microdelezioni nei soggetti con numero di spermatozoi >5mil sperm/ml e mai nei soggetti normozoospermici.

Diversi studi hanno indagato l'incidenza delle microdelezioni del cromosoma Y nei pazienti KS. Alcuni autori hanno rilevato un'associazione tra le microdelezioni del cromosoma Y e la sindrome KS, (Mitra et al., 2006; Hadjkacem-Loukil et al., 2009; Ceylan et al., 2010, Li et al., 2015) mentre altri appaiono in contrasto con questo dato, non evidenziando alcuna associazione tra le due alterazioni genetiche (Tateno et al., 1999; Lee et al., 2000; Ambasadhan et al., 2003; Choe et al., 2007; Balkan et al., 2008; Behulova et al., 2011, Simoni et al 2008, Rajpert-De Meyts et al. 2011, Zhang et al 2013)

Altro aspetto molecolare importante è l'inattivazione di uno dei due cromosomi X durante lo sviluppo in questi pazienti. In questi pazienti circa il 15% dei geni del cromosoma X sfugge alla normale inattivazione epigenetica inducendo una overespressione genica. Tale modificazione epigenetica potrebbe essere considerata la base genetica del fenotipo del Klinefelter. (Berletch et al.,2010). La grande variabilità fenotipica che si verifica in pazienti con sindrome di Klinefelter, infatti, può essere causata da diversi fattori quali polimorfismi genetici o effetti epigenetici che possono influenzare l'inattivazione del cromosoma X. Si può ipotizzare, quindi, che il fenotipo dei pz con Sindrome di Klinefelter potrebbe essere influenzato da:

- 1- un eccessivo dosaggio dei geni legati al cromosoma X causato da una alterata inattivazione genica (Carrel et al., 2005).
- 2- diverso grado di mosaicismo 46,XY
- 3- origine parentale del cromosoma X soprannumerario (Iitsuka et al.,2001)
- 4- funzione alterata dei geni che codificano per gli androgeni in quanto livelli subnormali portano a difetti di sviluppo testicolare (Lahlou et al., 2004).

Per quanto riguarda l'ipotesi della modificazione dell'inattivazione genica è da sottolineare che alcuni autori hanno evidenziato che l'inattivazione casuale di una delle due X potrebbe mascherare il fenotipo derivante da mutazioni recessive collegate al cromosoma X (Iitsuka et al., 2001, Yoshioka et al., 1998). Nei mammiferi con più di un cromosoma X, i geni di uno dei due cromosomi X non vengono espressi: questo fenomeno è noto come inattivazione del cromosoma X e si verifica nei maschi XXY così come nelle normali femmine XX (Chow JC et al., 2005). L'inattivazione del cromosoma X è un processo biologico che consiste nella disattivazione (perdita di funzione) di uno dei due cromosomi sessuali X presenti nelle loro cellule. Tale cromosoma viene "silenzioso", ovvero reso inerte dal punto di vista trascrizionale, tramite impacchettamento in un'unità densa di eterocromatina a formare una struttura inerte definita corpo di Barr; il risultato di tale processo è un'attenuata espressione, in tutte le cellule, dei geni portati dai cromosomi X, e dei fenotipi da essi manifestati.

Il gene deputato a tale processo è XIST (X inactive specific transcript), che trascrive un RNA espresso solo dal cromosoma inattivato e che non codifica per alcuna proteina. Agisce sul centro di inattivazione dell'X (Xic, X inactivation center) e non è espresso nel maschio con cariotipo normale (46, XY). Ognuno dei due cromosomi X dei maschi con sindrome di Klinefelter hanno la medesima probabilità di venire attivati, ma non tutti i geni vengono silenziati: il 15% rimane in duplice copia biallelica (Aksglaede et al., 2006; Wikström et al., 2004) e si ipotizza che la iperespressione di questi geni sia responsabile del fenotipo della sindrome.

In particolare il gene del recettore degli androgeni (AR), membro della super famiglia dei recettori nucleari, è regolato dai livelli di testosterone ed è oggetto di diversi studi genetici. Il gene AR è localizzato sul cromosoma X in posizione Xq11-12, codifica per un fattore di trascrizione ligando dipendente, e contiene una sequenza ripetuta polimorfica CAG nell'esone 1 codificante un tratto di poli-glutamina. L'estrema variabilità del numero delle ripetizioni determina la differente lunghezza del tratto nel dominio di trans-attivazione N-terminale (Zinn et al., 2005; Tirabassi et al., 2013; Francomano et al., 2013). Il numero di ripetizioni CAG può variare da 9 a 36 con variazioni tra le differenti etnie e gruppi razziali; infatti negli uomini caucasici sono presenti in media 21 ripetizioni, negli afro-Americani 18 e negli uomini asiatici 22 ripetizioni (Edwards et al., 1992). (Tirabassi et al., 2015). Nella donna quando il

processo di inattivazione della X non avviene correttamente, può verificarsi l'inattivazione non randomica degli alleli per il recettore degli androgeni (AR) con conseguente aumento dell'attività degli androgeni e irsutismo e ovaie policistiche (Calvo et al.,2000; Vottero et al., 1999). Mutazioni del gene nell'uomo sono associate a vari disordini tra cui la sindrome dell'insensibilità completa agli androgeni (Sills et al.,2002), disturbi dei neuroni motori e cancro della prostata (MacLean et al.,1995).

È stata dimostrata una relazione inversa tra il numero di ripetizioni nel tratto CAG e la trascrizione della proteina AR: sequenza più lunghe sono associate a una ridotta capacità trascrizionale con conseguente riduzione del meccanismo del feedback androgeno dipendente (Bogaert et al., 2009).

Diversi possono essere i target sotto il controllo del recettore degli androgeni in uomini eugonadici: dimensione della prostata (Giovannucci et al.,1999), concentrazione dei lipidi, dell'insulina e della leptina (Zitzmann et al., 2003), funzioni endoteliali (Zitzmann et al.,2001), densità dell'osso (Zitzmann et al., 2001; Chen et al., 2003), sviluppo cognitivo (Seidman et al., 2001; Harkonen et al., 2003) e concentrazione degli spermatozoi (Von Eckardstein et al.,2001). Il rischio di insorgenza del cancro alla prostata risulta aumentato in pazienti con ripetizioni più corte (Ntais et al., 2003).

Alla luce di tutto ciò scopo della mia tesi è stato quello di svolgere uno studio molecolare su pazienti affetti da Sindrome di Klinefelter, ed in particolare:

- 1- STUDIO 1 - identificare l'incidenza delle microdelezioni del cromosoma Y in pazienti con Sindrome di Klinefelter nella popolazione caucasica al fine di determinare se tale delezione possa aumentare il rischio di aneuploidie cromosomiche e possa avere un impatto nella gestione e nello screening genetico di questi pazienti. Al fine di valutare l'entità di tale alterazione genica nei KS abbiamo confrontato l'incidenza delle microdelezioni del cromosoma Y in pazienti KS rispetto ai pazienti con azoospermia non ostruttiva (NOA).
- 2- STUDIO 2 – analizzare la lunghezza delle ripetizioni CAG e se la variazione di tale polimorfismo possa influenzare il diverso fenotipo in tale sindrome

## **2- STUDIO 1**

### **Valutazione dell'incidenza delle microdelezioni in pazienti Klinefelter**

#### **3- MATERIALI E METODI**

##### **3.1- Pazienti**

Ho effettuato l'esame del liquido seminale e lo studio delle microdelezioni del cromosoma Y in 118 pazienti con sindrome di Klinefelter (età media  $26.7 \pm 9.5$ ) e 429 pazienti affetti da azoospermia non ostruttiva (NOA) (età media  $33.4 \pm 8.4$ ) che si sono presentati presso il Laboratorio di Seminologia-Banca del seme "*Loredana Gandini*", Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università di Roma "La Sapienza" per infertilità. 8 pazienti KS sul totale di 118 si sono sottoposti all'intervento chirurgico di TESE per la ricerca di spermatozoi nel testicolo. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico del Policlinico Umberto I-Università di Roma "La Sapienza". Il consenso informato scritto è stato ottenuto da tutti i partecipanti allo studio.

##### **3.2- Analisi seminale**

I campioni seminali sono stati raccolti attraverso masturbazione dopo un periodo di astinenza sessuale compreso tra 3-5 giorni. Tutti i campioni sono stati fatti fluidificare a  $37^{\circ}\text{C}$  for 60 min e sono stati poi valutati in base alle Linee guida del WHO (2010). Sono state prese in considerazione le seguenti variabili: volume dell'eiaculato (mL), pH, concentrazione spermatica ( $N \times 10^6 / \text{mL}$ ), numero totale di spermatozoi ( $N \times 10^6$  per eiaculato), motilità progressiva (%) e morfologia (% di forme anormali). Nei casi di azoospermia i campioni sono stati centrifugati a 4000 rpm per 10 minuti ed è stato valutato tutto il pellet. La presenza delle cellule germinali è stata valutata dopo la colorazione May-Grunwald Giemsa

##### **3.3- Biopsia testicolare**

Gli spermatozoi testicolari sono stati ottenuti mediante la biopsia testicolare (TESE). Il tessuto testicolare è stato posto in piccole piastre Petri contenenti Sperm Washing Medium (Irvine Scientific, USA) ed è stato micro-dissezionato meccanicamente attraverso l'uso di vetrini per il microscopio sterili. La presenza degli spermatozoi all'interno della piastra petri è stata valutata utilizzando il microscopio invertito (LEICA DMIL LED) al 400x di ingrandimento. Quando sono stati rinvenuti spermatozoi il campione è stato crioconservato per usi futuri.



### 3.4- Screening delle microdelezioni cromosoma Y

Tutti i pazienti sono stati sottoposti allo screening delle microdelezioni del cromosoma Y.

Il DNA genomico è stato estratto da leucociti di sangue periferico utilizzando il Kit di estrazione Wizard Genomic secondo le istruzioni del produttore (Promega Corporation Madison, WI, USA). La concentrazione e la purezza del DNA è stata determinata utilizzando il NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Le microdelezioni del braccio lungo del cromosoma Y sono state studiate mediante PCR, utilizzando un set di primer sequenza sito specifica (STS), i quali amplificano l'AZFa, AZFb e l' AZFc del cromosoma Y; sY86, USP9Y e DBY per AZFa; sY127, sY142 e RBM per AZFb; sY158, sY254 e sY255 per AZFc. SRY e ZFX/ ZFY sono stati utilizzati come controlli interni positivi. Il DNA genomico è stato estratto da un uomo fertile e una donna che vengono utilizzati come controllo esterno. I primer sono stati prodotti dalla Eurofins Genomics (Milano Italia). STS sono considerati deleti a seguito di tre amplificazioni fallimentari.

Le variabili continue sono presentate come media e DS. Le variabili categoriche sono presentate come percentuali. Le differenze sono state valutate con il test esatto di Fisher. A two tailed p value <0.05 è considerato statisticamente significativo. Le analisi sono state condotte utilizzando il programma Graph Pad Prism 6.

## **4- RISULTATI**

### 4.1- Analisi seminale

Sono stati studiati 547 pazienti, di cui 118 Klinefelter (2 mosaici e 116 non mosaici) e 429 NOA con cariotipo normale. Su tutti i pazienti è stato eseguito l'esame del liquido seminale. Dei 118 Klinefelter, 2 pazienti sono risultati criptozoospermici, 2 con spermatozoi nell'eiaculato mentre i restanti tutti azoospermici. Le medie e DS delle caratteristiche seminali dei pazienti azoospermici sono schematizzate nella Tabella 1.

**Tabella 1** Caratteristiche seminali dei pazienti NOA e dei pazienti Klinefelter azoospermici

<i>Pazienti</i>	<i>Età (anni)</i>	<i>Volume (mL)</i>	<i>pH</i>	<i>Cellule germinali</i>
<b>NOA</b> (N=429)	33.4 ± 8.4	3 ± 1.4	7.4 ± 0.2	22 %
<b>KS</b> (N=114)	26.7 ± 9.5	1.8 ± 1.2	7.5 ± 0.2	4.4 %
<i>p value</i>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>ns</b>	<b>&lt;0.001</b>

Nei pazienti KS volume seminale era statisticamente ridotto rispetto al gruppo di pazienti NOA ( $p < 0.001$ ), come anche la percentuale di cellule germinali nel liquido seminale dei pazienti KS vs NOA ( $p < 0.001$ ) (4.4% vs 22%)  $p < 0.001$ .

Tra gli 8/118 pazienti KS che si sono sottoposti alla biopsia testicolare, sono stati recuperati spermatozoi in 3 pazienti.

#### 4.2- Analisi delle microdelezioni nei NOA

Dall'analisi delle microdelezioni del cromosoma Y, 46/429 pazienti NOA sono risultati deleti nella regione AZF, con una percentuale di delezione pari a 10,7 %. 8 pazienti avevano una delezione AZFa+b+c; 6 pazienti erano deleti nell'AZF b+c, 4 pazienti nella regione AZFa, 8 pazienti nella regione AZF b e 20 pazienti nella regione AZFc (Tabella 2).

**Tabella 2.** Localizzazione delle microdelezione del cromosoma Y (AZF a,b,c) in pazienti NOA (N=429)

<i>N pazienti con microdelezioni</i>	<i>Frequenza delle delezioni AZF</i>	<i>AZFa SY86 USP9Y DBY</i>	<i>AZFb SY127 SY142 RBM</i>	<i>AZFc SY158 SY254 SY255</i>
8	1.9 %	X	X	X
6	1.4 %		X	X
4	0.9 %	X		
8	1.9 %		X	
20	4.6 %			X
<b>Tot 46/429</b>	<b>10,7 %</b>			

#### 4.3- Analisi delle microdelezioni in KS

1/118 ha rilevato una la delezione completa della regione AZFc con una percentuale di delezione pari al 0.8 %.

Tale paziente deleto era non-mosaico KS e all'esame del liquido seminale era azoospermico.

L'incidenza di microdelezione nei pazienti KS è risultata significativamente più bassa rispetto a quella osservata per i pazienti NOA ( $p < 0.001$ ).

### **5- DISCUSSIONE**

La sindrome KS è una anomalia cromosomica osservata nell'uomo con una frequenza dello 0.1–0.2% nella popolazione maschile. Nella popolazione infertile maschile, la prevalenza dei KS risulta ancora più alta, da un 3% fino ad un 13% in pazienti azoospermici (Van Assche et al 1996; Vincent et al. 2002) e per tale motivo la sindrome KS è la più frequente causa genetica dell'azoospermia.

Dall'esame del liquido seminale effettuato in pazienti KS e NOA abbiamo trovato che nei pazienti KS azoospermici sono presenti in maniera minore (4%) cellule germinali nel liquido piuttosto che nei NOA (22%), in accordo con il progressivo quadro di alterazione del tessuto testicolare e degenerazione delle cellule germinali caratteristico dei pazienti KS (Aksglaede & Juul 2013, Lin YM et al., 2004). Inoltre in accordo con quanto descritto in letteratura, nei pazienti KS abbiamo osservato una riduzione del volume seminale (Aksglaede et al 2009).

È stato precedentemente riportato che la spermatogenesi dei pazienti KS può declinare con l'età (Emre et al., 2006; Ichioka et al., 2006). La probabilità di ottenere spermatozoi nell'eiaculato è maggiore se il seme è stato raccolto in KS adolescenti prima che avvenga la distruzione dell'epitelio germinativo che si verifica a metà della pubertà (Aksglaede et al 2009).

Nella nostra casistica, due pazienti KS sono risultati criptozoospermici, due presentavano spermatozoi nell'eiaculato e in tre pazienti sono stati recuperati spermatozoi nel testicolo attraverso TESE e la media dell'età di questi pazienti era di

24,7 anni. Inoltre l'età media dei pazienti TESE positivi (N=3) era 17.3 anni rispetto ai pazienti TESE negativi (N=5), era pari a 26,6 anni.

Per quanto riguarda l'origine delle aneuploidie nei pazienti con KS sono state fatte diverse ipotesi. E' stata dimostrata un'associazione tra ricombinazione aberrante e aumento dell'età materna, mentre l'ipotesi di un'associazione tra XXY di origine paterna e l'età paterna rimane tuttora materia di dibattito. (Maiburg et al 2012)

Altre ipotesi hanno preso in considerazione le regioni PAR. Entrambi i cromosomi sessuali contengono queste brevi regioni di omologia dette regioni pseudoautosomiali (PAR) in quanto si comportano come autosomi e ricombinano durante la meiosi (Helena Mangs and Morris, 2007) durante la meiosi maschile i cromosomi X e Y (per larga parte non omologhi) si accoppiano in corrispondenza delle estremità delle loro braccia corte e lunghe, le cosiddette regioni pseudoautosomiali 1 e 2 (PAR1 and PAR2). Mentre la regione PAR1 si estende per 2.6 Mb lungo le estremità delle braccia corte di entrambi i cromosomi X e Y, PAR2 si estende per 320 kb le estremità delle braccia lunghe (Freije et al., 1992, Rappold, 1993).

E' stato ipotizzato che delezioni nelle regioni PAR potessero interferire con la ricombinazione meiotica e quindi essere la causa degli eventi di non disgiunzione nei casi dei Klinefelter di origine paterna. Però, tale ipotesi non sembra essere stata confermata dallo studio di Thomas et al. (2000) che non ha individuato nessuna associazione tra le delezioni PAR1 e l'assenza di ricombinazione in uomini Klinefelter (Thomas et al 2000).

Anche la presenza di altre delezioni sul braccio lungo del cromosoma Y in uomini KS, come le delezioni delle regioni AZF, sono state oggetto di interesse. Infatti, è stato ipotizzato che tali delezioni potessero interferire con la meiosi durante la ricombinazione dei cromosomi sessuali e quindi incrementare la frequenza di non disgiunzione.

Il ruolo delle microdelezioni del cromosoma Y nell'infertilità maschile è noto da tempo ed è stato ampiamente dimostrato che le microdelezioni del braccio lungo del cromosoma Y sono associate con difetti della spermatogenesi (van der Ven et al., 1997; Foresta et al., 1998; Dada et al., 2002; Thangaraj et al., 2003; Chiang et al., 2004). La microdelezione della regione AZF può avvenire a livello di 3 subregioni dell'AZF (AZFa, AZFb, AZFc), e a seconda della subregione deleta, ne conseguono diversi

quadri di spermatogenesi (Li et al., 2008; Wang et al., 2010). Per esempio la microdelezione in AZFa è associata a sindrome solo cellule del Sertoli, mutazioni in AZFb indicano arresto della spermatogenesi a livello della meiosi I, mentre mutazioni in AZFc sono state associate a ipospermatogenesi con progressione a severe azoospermia or severa oligospermia (Ferrás et al., 2004; Foresta et al., 2005; Zhou et al., 2006; Arruda et al., 2007; Wang et al., 2010; Behulova et al., 2011). La frequenza delle microdelezioni del cromosoma Y nei pazienti azoospermici non ostruttivi si attesta intorno al 10%. (Foresta et al 2001).

I pazienti KS possono avere microdelezioni a carico del braccio lungo del cromosoma Y anche se risultati conflittuali sono stati riportati riguardo la prevalenza di tali delezioni nei pazienti KS. Infatti alcuni studi hanno rivelato un aumento delle microdelezioni dell'AZF in pazienti KS azoospermici, suggerendo che tali delezioni potessero giocare un ruolo nel background genetico per il fenotipo dei KS (Mitra et al., 2006; Hadjkacem-Loukil et al., 2009; Ceylan et al., 2010, Li et al., 2015). Altri gruppi, invece, non hanno trovato alcuna associazione tra questi due disordini genetici (Tateno et al., 1999; Lee et al., 2000; Ambasudhan et al., 2003; Choe et al., 2007; Balkan et al., 2008; Behulova et al., 2011 Simoni et al 2008, Rajpert-De Meyts et al. 2011, Zhang et al 2013).

Mitra et al (2006) hanno riscontrato una elevata incidenza di microdelezioni del cromosoma Y nei pazienti KS. Delezioni combinate dell'AZFa e AZFb sono infatti state riscontrate nel 28,6% dei pazienti, ovvero in 4 dei 14 KS patients indiani studiati. L'analisi del cariotipo e la FISH hanno rilevato un assetto cromosomico 47XXY/46XY in 3 dei 4 Klinefelter mentre l'altro paziente deuto aveva un assetto 46XY/47XXY/48XXXY/48XXYY.

Anche Hadjkacem et al (2009) hanno dimostrato una forte associazione tra la sindrome di Klinefelter e le delezioni dell'AZF. Lo studio, infatti, ha identificato la delezione parziale nelle tre regioni dell'AZF in 3 pazienti Klinefelter su 9 mentre in 3 pazienti è stata riscontrata la delezione totale delle tre zone dell'AZF, con una frequenza pari a circa il 67%.

La delezione della sola regione AZFc è stata, invece, osservata in uno studio successivo condotto su 14 pazienti KS di origine turca, con una percentuale di delezione pari al 35,7%. (Ceylan et al 2010).

Percentuali molto inferiori di delezione del cromosoma Y nei pazienti KS sono state ottenute, invece, da Simoni et al. (2008) che hanno individuato in una casistica più ampia di pazienti KS pari a 208 pazienti una delezione parziale nell'AZFb in un solo paziente KS, solamente nell'STS sY134.

In accordo con questi dati, Rajpert-De Meyts et al. (2011) performed un analisi of the integrity of the AZF region in 77 pazienti (>95% Danish men) con cariotipo non-mosaic 47,XXY, non trovando alcuna delezione completa nelle regioni AZFa, AZFb e AZFc. Soltanto sei pazienti con KS presentavano delezioni gr/gr e b2/b3 in AZFc. Le delezioni gr/gr sono considerate un fattore di rischio per infertilità, mentre le delezioni b2/b3 delle varianti polimorfiche, la cui prevalenza varia a seconda della popolazioni prese in esame, dipende dal background del cromosoma Y. In ogni caso la frequenza delle suddette delezioni nei pazienti KS era sovrapponibile a quella osservata negli uomini infertili con cariotipo normale.

Risultati simili sono stati ottenuti da Li et al. (2015) in the popolazione di Sichuan. Tali autori hanno indagato l'incidenza delle microdelezioni del cromosoma Y in 111 pazienti Klinefelter cinesi e 94 uomini fertili ed hanno rilevato in 1 solo paziente Klinefelter delezione dell'AZF b+d+c e in 27 pazienti Klinefelter delezioni parziali dell'AZFc.

In oltre, nessuna microdeletion dell'AZF è stata trovata in uno studio condotto su 80 pazienti KS provenienti dalla Northeast China ( Zhang et al 2013), facendo uno screening del cromosoma Y usando 9 specifici STSs che coprono l'AZFa, AZFb, AZFc, and AZFd.

In conclusione i dati riguardanti le microdelezioni del cromosoma Y nei pazienti KS risultano in contraddizione e sebbene abbiamo indicato un aumento della prevalenza delle delezioni dell'AZF, studi più recenti, con casistiche più ampie, sembrano non confermare la delezione completa dell' AZFa, AZFb, or AZFc in uomini con la sindrome di Klinefelter.

Il mio studio, condotto su una popolazione italiana, ha identificato una delezione nella regione AZFc in un solo paziente su 118 con sindrome di Klinefelter, dimostrando che la frequenza delle microdelezioni del cromosoma Y non è incrementata nei pazienti KS ed è più bassa rispetto pazienti infertili NOA con cariotipo normale. Infatti mentre la frequenza di delezione del cromosoma Y osservata nella nostra casistica di pazienti KS si attesta intorno all'1%, la frequenza di delezione dei pazienti NOA è risultata intorno

all'11%, in accordo con i dati presenti in letteratura (Foresta et al 2001). La bassa frequenza di microdelezioni da noi riscontrata nei pazienti Klinefelter suggerisce quindi che le microdelezioni non hanno un ruolo centrale nella errata disgiunzione dei cromosomi sessuali alla base dell'insorgenza della patologia genetica.

La Tabella 3 mostra l'incidenza delle AZF microdeletion nei pazienti KS.

**Tabella 3.** Frequenza delle microdelezioni dell'AZF in pazienti con sindrome di Klinefelter nel presente studio e nei precedenti.

	<i>Paese</i>	<i>N pazienti</i>	<i>N pazienti con Delezione completa</i>	<i>Frequenza della delezione completa di AZF</i>	<i>Subregioni delete</i>
Oliva et al., 1998	Spain	2	1	50%	AZF c
Tateno et al., 1999	Japan	21	0	/	/
Lee et al., 2000	Korea	6	0	/	/
Peterlin et al., 2002	Slovenia	5	1	20%	AZF c
Ambasudhan et al., 2003	India	8	0	/	/
Mitra et al., 2006	India	14	4	28.6%	AZF a+b
Pina-neto et al., 2006	Brazil	10	0	/	/
Mohammed et al., 2007	Kuwait	3	1	33.3%	AZF c
Choe et al., 2007	Korea	95	0	/	/
Simoni et al., 2008	Germany	208	0 <sup>a</sup>	/	/
Plaseski et al., 2008	Macedonia	10	0	/	/
Balkan et al., 2008	Turkey	7	0	/	/
Hadjkacem-Loukil et al., 2009	Tunisi	9	6 <sup>b</sup>	67%	AZFa AZFb, AZF a+b+ c
Ceylan et al 2010	Turkey	14	5	35.71%	AZFc
Behulova et al., 2011	Slovakia	12	0	/	/
Rajpert-De Meyts et al., 2011	Denmark	77	0	/	/
Zhang et al 2013	China	80	0	/	/
Dos Santos Godoy et al., 2014	Brazil	2	0	/	/
Li et al., 2015	China	111	1	0.9%	AZF b+d+c
<b>Presente studio</b>	Italy	118	1	0.8%	AZFc

<sup>a</sup> un paziente con delezione parziale dell- AZFb (sY134)

<sup>b</sup> 3 pazienti con delezione parziale dell-AZFc (gr/gr)

Ad oggi grazie alle tecniche chirurgiche combinate con quelle di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) è possibile dare una speranza riproduttiva anche ai pazienti con azoospermia non ostruttiva, qualora sia possibile il recupero di spermatozoi mediante TESE o microTESE.

La possibilità di utilizzare spermatozoi testicolari per l'iniezione intra-citoplasmatica degli spermatozoi (ICSI) è stata proposta anche per pazienti affetti dalla sindrome di Klinefelter (Denschlag et al., 2004). La letteratura fino a qualche anno fa mostrava che gli spermatozoi testicolari potevano essere recuperati da KS non mosaico con una percentuale tra il 16 e il 69% (Okada et al., 2005). Recentemente una metanalisi di Corona et (2017) ha evidenziato che la percentuale di recupero degli spermatozoi mediante TESE/microTESE in KS si attesta intorno al 50%, percentuale simile a quella osservata per i NOA causata da altri fattori eziologici (Bakircioglu et al., 2011) e ha riportato la nascita di 218 bambini dopo 410 cicli ICSI in pazienti KS.

Madureira et al., 2014 in uno studio retrospettivo riferisce la nascita di 173 bambini con cariotipo normale da ICSI di pazienti KS non mosaico.

D'altro canto, la diagnosi genetica preimpianto (PGD) ha rilevato un più alto tasso di embrioni con anomalie negli autosomi 18 e 21 in pazienti KS (Staessen et 2003). I dati contraddittori tra gli embrioni e i bambini nati potrebbe essere spiegata attraverso la riduzione del tasso di impianto degli embrioni anormali (Shinji et al., 2002).

Un'altra questione critica riguarda il rischio di trasmissione delle microdelezioni del cromosoma Y alla prole maschile, in particolare per quei pazienti che presentano delezione AZFc, ma che posseggono spermatozoi nell'eiaculato o nel testicolo prelevati mediante biopsia testicolare. Komori et al. (2002) reported che le microdelezioni potevano essere ereditate. Due dei tre figli studiati presentavano le stesse microdelezioni del padre, mentre il terzo figlio presentava delezioni più lunghe (Komori et al 2002) Più recentemente è stata dimostrata la trasmissione verticale di questa delezione nel 100% dei casi studiati. (Colaco et al 2018) Non solo, in alcuni casi la delezione parziale di AZFc ha portato alla delezione completa nella prole. (Zhang et al 2007). La trasmissione della delezione AZFc non sembra avere alcun effetto somatico, sulla progenie maschile, ma la trasmissione di tale microdelezione da padre a figlio potrebbe avere effetti avversi sulla futura fertilità maschile.



Concludendo, in accordo con precedenti studi (Lee et al., 2000; Plaseski et al., 2008; Behulova et al., 2011; Rajpert-De et al., 2011) i miei risultati suggeriscono che le delezioni del cromosoma Y non sembrano influenzare gli eventi di non disgiunzione dei cromosomi sessuali paterni e non sembrano causare la perdita dei cromosomi X. La percentuale delle microdelezioni nei nostri pazienti KS è più bassa rispetto ai nostri pazienti NOA, suggerendo che le microdelezioni dell'AZF nei KS non hanno un ruolo genetico nella sindrome. Per questa ragione lo studio delle microdelezioni del cromosoma Y non sembra essere una parte fondamentale per lo studio diagnostico dei KS e nemmeno per il counseling genetico dei pazienti che decidono di accedere alla fecondazione assistita.

## **6- STUDIO 2**

### **Valutazione dei CAG repeats in pazienti Klinefelter**

## **7- MATERIALI E METODI**

### **7.1- Pazienti**

Ho effettuato l'esame del liquido seminale e lo studio del polimorfismo dei CAG repeats del recettore degli androgeni in 78 pazienti con sindrome di Klinefelter (età media  $31.9 \pm 10.4$ ) che si sono presentati presso il Laboratorio di Seminologia-Banca del seme "Loredana Gandini", Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università di Roma "La Sapienza" per infertilità. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico del Policlinico Umberto I-Università di Roma "La Sapienza". Il consenso informato scritto è stato ottenuto da tutti i partecipanti allo studio.

### **7.2- Analisi seminale**

I campioni seminali sono stati raccolti per masturbazione dopo un periodo di astinenza sessuale compreso tra 3-5 giorni. Tutti i campioni sono stati fatti fluidificare a 37°C for 60 min e sono stati poi valutati in base al WHO (2010).

### **7.3- Estrazione del DNA genomico**

Il DNA genomico è stato estratto da leucociti di sangue periferico utilizzando il Kit di estrazione Wizard Genomic.

### **7.4- Amplificazione PCR per valutare il numero dei CAG repeats**

La lunghezza dei frammenti polimorfici e il numero delle ripetizioni CAG sono state amplificate utilizzando primer fiancheggianti la sequenza ripetuta. Per la PCR sono stati utilizzati il primer forward marcato con il fluorocromo FAM al 5' per permettere la rilevazione durante il sequenziamento: 5'-TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC-3', insieme al primer reverse 5'-GCTGTGAAGTTGCTGTTCCCTCAT-3'.

Il protocollo di amplificazione è il seguente: 10 min a 95°C seguito da 30 cicli di 45 sec a 94°C, 30 sec a 59°C e 1 min a 72°C seguito da 7 min a 72°C.

#### 7.5- Valutazione della percentuale di inattivazione dei due alleli sul cromosoma X

Lo stato di metilazione dell'allele AR è stato valutato utilizzando l'enzima di restrizione HpaII (Promega, Madison, WI, USA). L'allele non metilato, quindi attivo, è stato digerito dall'enzima e non è stato amplificato mentre i siti metilati non vengono digeriti, rimanendo intatti e amplificabili. Un microgrammo di DNA genomico è stato digerito a 37°C per 6 ore, con 20 U di enzima di restrizione HpaII secondo le istruzioni del produttore, seguito da un'incubazione a 65°C per 30 min per inattivare l'enzima. La reazione di amplificazione, sia per i campioni digeriti che per i campioni non digeriti, è stata condotta in un volume di 25 µL (0.5 ng gDNA, 0.8 µM di ciascun primer, 12.5 µL di Ampli Taq Gold 360 Master Mix – Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). L'elettroforesi capillare viene condotta in 10 µL di mix di reazione (2.5 µL di prodotto PCR, 0.3 µL di Gene Scan Liz 600 - Applied Biosystems, 7.7 µL di formammide) e i campioni prima di essere posti nel 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) vengono denaturati 5 min a 95°C.

#### 7.6- Sequenziamento con analisi di frammenti

I frammenti amplificati sono stati analizzati mediante il software Gene Mapper Analysis (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA).

#### 7.7- Analisi dell'inattivazione del cromosoma X

La fluorescenza totale dell'area del picco per entrambi gli alleli digeriti e non digeriti è stato calcolato mediante il software Gene Mapper Analysis (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA). Mediante questo dato è stata calcolata la percentuale di inattivazione dei due alleli. Le variabili sono state contrassegnate come: allele 1 digerito (A), allele 2 digerito (B), allele 1 non digerito (C) e allele 2 non digerito (D). L'area che sottende i picchi C e D dovrebbe essere uguale, ma nella realtà non si verifica. Per compensare l'amplificazione degli alleli dovuta a fattori confondenti non causati dalla metilazione, i segnali C e D (campioni non digeriti) vengono utilizzati per creare un fattore di correzione:

- inattivazione dell'allele 1:  $(A / C) / (A / C + B / D)$  (equazione I)
- inattivazione dell'allele 2:  $(B / D) / (A / C + B / D)$  (equazione II)

Un valore di inattivazione di 0 equivale a nessuna inattivazione, 1 sarebbe inattivazione completa e 0.5 è inattivazione casuale. La somma dell'inattivazione degli alleli 1 e 2 deve essere uguale a 1 (equazione I + Equazione II = 1). Le equazioni I e II sono state utilizzate in uno studio precedentemente pubblicato (Iitsuka et al., 2001).

Nel mio studio ho considerato l'inattivazione del cromosoma X di tipo *skewed* quando si ha l'inattivazione maggiore dell'70% di uno dei due alleli.

#### 7.8- Analisi statistica

Le variabili continue sono state presentate come media, deviazione standard e mediana, dove appropriato in funzione della curva di distribuzione dei dati, valutata tramite test di Kolmogorov-Smirnov. Le differenze tra gruppi sono state analizzate tramite il test t di Student o U di Mann-Whitney, dove appropriato. Le variabili categoriche sono state presentate come conteggi e/o percentuali ed eventuali differenze sono state valutate tramite il test esatto di Fisher. Un valore di  $p < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 25.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

## 8- RISULTATI

Ho studiato 78 Klinefelter (3 mosaici e 75 non mosaici) ai quali è stato eseguito l'esame del liquido seminale. Dei 78 Klinefelter, 4 pazienti sono risultati criptozoospermici mentre i restanti azoospermici. La tabella 4 riporta le caratteristiche demografiche, seminali ed ormonali dei soggetti studiati.

**Tabella 4:** parametri antropometrici, seminali e ormonali dei pazienti KS

KS ( 78 pz )	
<i>Età (anni)</i>	<b>31,8 ± 10,2</b>
<i>Altezza (cm)</i>	<b>183,7 ± 7,9</b>
<i>Peso (Kg)</i>	<b>85,6 ± 20,0</b>
<i>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</i>	<b>25,4 ± 5,8</b>
<i>Volume (ml)</i>	<b>1,7 ± 1,2</b>
<i>pH</i>	<b>7,5 ± 0,2</b>
<i>FSH (mUI/ml)</i>	<b>22,6 ± 13,8</b>
<i>LH (mUI/ml)</i>	<b>11,7 ± 7,3</b>
<i>Testosterone tot. (nmol/l)</i>	<b>12,4 ± 7,7</b>
<i>Volume testicolare blt (ml)</i>	<b>6,8 ± 3,6</b>

### 8.1- Studio dei CAG repeats

Per tutti i pazienti Klinefelter sono stati studiati, mediante analisi di frammenti, i CAG repeats del promotore del gene AR, codificato nel cromosoma X.

40 dei 78 pazienti KS (51%) erano eterozigoti per il tratto polimorfico del recettore del gene AR mentre i restanti pazienti erano omozigoti. In particolare per i 40 pazienti eterozigoti la mediana dei CAG repeats dell'allele 1 era pari a 20 ( range 9-26) mentre per quanto riguarda l'allele 2 la mediana era pari a 24 (range 16 - 30). I 38 pazienti omozigoti presentano una mediana dei CAG repeats pari a 22 ( range 19 -28) (Tabella 5). Non sono state riscontrate differenze significative dei parametri antropometrici, seminali ed ormonali tra i pz con omozigosi ed eterozigosi del tratto polimorfico CAG repeats (Tabella 6).

**Tabella 5:** Analisi CAG repeats pazienti omozigoti e eterozigoti

<b>KLINEFELTER</b> (N=78)	<b>NUMERO</b> <b>PAZIENTI</b>	<b>MEDIANA CAG</b>	<b>RANGE</b>
<b>OMOZIGOTI</b>	38 (49%)	23	19-28
<b>ETEROZIGOTI</b>	40 (51%)	ALLELE 1= 20	9-26
		ALLELE 2= 24	16-30

**Tabella 6:** Media, deviazione standard, mediana e *p value* dei parametri antropometrici, seminali ed ormonali dei pazienti KS

		<b>Età</b>	<b>Altezza (cm)</b>	<b>Peso (Kg)</b>	<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Volume (ml)</b>	<b>pH</b>	<b>FSH (mIU/ml)</b>	<b>LH (mIU/ml)</b>	<b>Testosterone Tot (nmol/l)</b>	<b>Volume testicolare bilaterale (ml)</b>
<b>Eterozigote</b>	<b>Media</b>	33	183,3	83,5	24,7	2,0	7,5	23,3	11,8	11,9	6,6
	<b>DS</b>	11	8,2	22,5	5,6	1,4	0,2	14,6	7,9	8,6	3,4
	<b>Mediana</b>	36	183,0	80,0	23,5	1,8	7,5	22,0	10,5	12,5	6,0
<b>Omozigote</b>	<b>Media</b>	30	184,0	88,0	26,2	1,4	7,5	21,9	11,6	12,9	7,0
	<b>DS</b>	10	7,7	17,0	6,0	1,0	0,2	13,0	6,7	6,7	4,0
	<b>Mediana</b>	29	184,5	85,0	25,2	1,2	7,5	20,9	11,2	13,9	5,8
	<b>p value</b>	0,130	0,541	0,89	0,160	0,137	0,279	0,372	0,856	0,277	0,857

### 8.2- Studio dell'inattivazione del cromosoma X

Lo studio di metilazione è stato effettuato in 28 dei 40 pazienti eterozigoti per valutare la percentuale di inattivazione preferenziale a carico di uno dei due alleli del cromosoma X.

Dei 28 pazienti 6 avevano una inattivazione *skewed* mentre i restanti una inattivazione random. In particolare 2 dei 6 skewed avevano una inattivazione preferenziale dell'allele corto (allele 1) mentre i restanti 4 dell'allele lungo (allele 2). Nei restanti 22

pazienti con inattivazione random la media di inattivazione dell'allele 1 era di  $48,7 \pm 9,4$  mentre dell'allele 2 era  $51,1 \pm 9,2$  (Tabella 7).

Non sono state riscontrate differenze significative nei parametri antropometrici, seminali, ormonali e volumi testicolari tra pazienti con diversa tipologia di inattivazione (*skewed* vs random).

**Tabella 7:** Percentuale di inattivazione dei due alleli nei pazienti KS eterozigoti

<b>KS ETEROZIGOTI</b>	<b>NUMERO PAZIENTI</b>	<b>ALLELI</b>	<b>INCIDENZA</b>
<b>INATTIVAZIONE SKEWED</b>	6/28 (21,4%)	ALLELE 1 (N=2)	1 > 70%, 1 >80%
		ALLELE 2 (N=4)	4 > 70%
<b>KS ETEROZIGOTI</b>	<b>NUMERO PAZIENTI</b>	<b>ALLELI</b>	<b>MEDIA</b>
<b>INATTIVAZIONE RANDOM</b>	22/28 (78,6%)	ALLELE 1	$48,7 \pm 9,4$
		ALLELE 2	$51,1 \pm 9,2$

## 9- DISCUSSIONE

Alla luce dei dati presenti in letteratura ancora non è chiara la relazione tra il genotipo e il fenotipo nei Klinefelter. Diversi meccanismi genetici correlati al cromosoma X come il recettore degli androgeni sono stati studiati come possibili candidati nel fenomeno. Questi meccanismi genetici includono l'origine parentale del cromosoma X soprannumerario, i pattern di inattivazione del cromosoma X e la lunghezza del polimorfismo dei CAG repeats.

Il cariotipo 47, XXY deriva da una mancata disgiunzione, che può essere una non disgiunzione paterna durante la prima divisione meiotica (50% dei casi) o non disgiunzione materna durante la prima o seconda divisione meiotica o durante le divisioni post-zigotiche (50 % dei casi) (Thomas, Hassold 2003; Jacobs et al., 1988). È stato proposto che l'origine parentale del cromosoma X soprannumerario potesse avere un impatto sul fenotipo dei Klinefelter. Le evidenze non sono così chiare in quanto la maggior parte degli studi non trovano associazione tra i due fenomeni (Skakkebaek et al., 2014; Zeger et al., 2008; Ross et al., 2008; Zinn et al., 2005) mentre altri trovano un effetto dell'origine parentale su tratti fenotipici quali la funzione motoria e il linguaggio (Stemkens et al., 2006), l'autismo e tratti schizotipici (Bruining et al., 2010), la comparsa della pubertà (Wilkstrom et al., 2006), sul peso- altezza e il rapporto di apertura delle braccia (Chang et al., 2015).

Nei Klinefelter, così come nelle donne, uno dei due cromosomi X viene inattivato precocemente durante l'embriogenesi con un processo che avviene in maniera randomica (Lyon 1961) ed è stata rilevata una inattivazione del cromosoma X di tipo preferenziale (*skewed*) di circa l'80% di uno degli alleli. L'inattivazione *skewed* nei Klinefelter si verifica con un'incidenza maggiore del 43% (Tuttelmann, Gromoll; 2010). Tale inattivazione preferenziale del cromosoma X si è supposto che potesse essere il risultato del silenziamento genico di origine materna e/o paterna e da ciò potesse dipendere la variabilità nel fenotipo dei Klinefelter (Chang et al, 2015; Ross et al., 2008; Skakkebaek et al., 2014; Zinn et al., 2005, Bojesen et al., 2011; Zitzmann et al., 2004). Per tale motivo diversi gruppi di studio si sono occupati di analizzare la lunghezza dei CAG repeats e il grado di inattivazione dei due alleli del cromosoma X ma i dati derivanti sono contrastanti in quanto le casistiche analizzate sono differenti per



numerosità campionaria e le metodiche utilizzate per l'analisi dei CAG repeats sono differenti.

Dai dati presenti in letteratura si evidenzia che i KS sono in prevalenza eterozigoti per i due alleli del cromosoma X (Jorgensen et al., 2015; Skakkebaek et al., 2014, Bojesen et al., 2011, Ross et al., 2008, Zinn et al., 2005, Zitzmann et al., 2004, Iitsuka et al., 2001, Suzuki et al., 2001), mentre solo un lavoro identifica una presenza maggiore di KS omozigoti (Wikstrom et al., 2006) (Tabella 8). Dai miei dati gli omozigoti e gli eterozigoti sono presenti in ugual numero. Per quanto riguarda l'analisi dei CAG repeats nei KS eterozigoti nel mio studio il numero di ripetizioni per l'allele 1 è pari a 20 e per l'allele 2 è pari a 24 in linea con i dati presenti in letteratura (Skakkebaek et al., 2014, Bojesen et al., 2011, Vorona et al., 2007, Wikstrom et al., 2006, Suzuki et al., 2001). Nei KS omozigoti ho riscontrato un numero di ripetizioni per i due alleli pari a 23, in accordo con i dati della letteratura (Bojesen et al., 2011, Wikstrom et al., 2006, Suzuki et al., 2001).

**Tabella 8:** Analisi dei CAG repeats nei KS degli studi presenti in letteratura.

	NUMERO PAZIENTI	ETEROZIGOTI/ OMOZIGOTI	MEDIA CAG
Iitsuka et al., 2001	14 XXY	14 KS Eterozigoti	/
Suzuki et al., 2001	13 XXY	7 KS Eterozigoti	ALLELE 1: 21,1 ± 2,1 ALLELE 2: 24,7 ± 2,6
		6 KS Omozigoti	22,8 ± 3,3 (17-27)
Zitzmann et al., 2004	77 XXY	46 KS Eterozigoti	/
		31 KS Omozigoti	/
Zinn et al., 2005	35 XXY (1 MOSAICO)	22 KS Eterozigoti	/
		13 KS Omozigoti	/
Wikstrom et al., 2006	14 XXY	6 KS Eterozigoti	ALLELE 1: 20 ± 1,1 ALLELE 2: 22,7 ± 1,9
		8 KS Omozigoti	22,4 ± 3,0
Vorona et al., 2007	101 XXY	101 KS Eterozigoti	ALLELE 1: 20 ± 2,6 % ALLELE 2: 22,5 ± 2,9 %
Ross et al., 2008	48 XXY (1 MOSAICO)	30 KS Eterozigoti	MEDIANA = 21 (16-26)
		16 KS Omozigoti	23 KS CAG > 21, 23 KS CAG < 21
Bojesen et al., 2011	70 XXY	46 KS Eterozigoti	ALLELE 1: 21 (11-26) ALLELE 2: 23,5 (19-31)
		24 KS Omozigoti	23 (19-30)
Skakkebaek et al., 2014	73 XXY	42 KS Eterozigoti	MEDIANA ALLELE 1: 20 (18-24) MEDIANA 24 ALLELE 2: 24 (19-31)
		31 KS Omozigoti	MEDIANA = 21 (17-26)
Jorgensen et al., 2015	58 XXY	34 KS Eterozigoti	/
		24 KS Omozigoti	/
<b>Presente studio</b>	78 XXY	38 KS Eterozigoti	MEDIANA = 23 (19-28)
		40 KS Omozigoti	ALLELE 1= 20 (9-26) ALLELE 2= 24 (16-30)

Gli studi sull'inattivazione del cromosoma X mostrano che nei pazienti KS eterozigoti è presente un inattivazione di tipo random piuttosto che un inattivazione di tipo *skewed* (Tabella 9). Anche nella mia casistica ho riscontrato la prevalenza dell'inattivazione di tipo random in quanto si verifica in 22 pazienti su 28 KS analizzati (Tabella 7).

**Tabella 9:** Analisi dell'inattivazione del cromosoma X nei KS degli studi presenti in letteratura.

	N pz ks eterozigoti	Tipo inattivazione	allele inattivato	allele preferenzialmente inattivato
Iitsuka et al., 2001	14	9 inattivazione random	/	/
		5 inattivazione <i>skewed</i>	2 > 70 % ( 70-72) 3 > 80% ( 80-87)	/
Suzuki et al., 2001	7	5 inattivazione random	inattivazione preferenziale allele 2	lungo
		2 inattivazione <i>skewed</i>	> 90%	/
Zitzmann et al., 2004	46	/	allele 1: 59 ± 15 % allele 2: 41 ± 15 %	corto
Zinn et al., 2005	22	/	inattivazione preferenziale allele 2	lungo
Wikstrom et al., 2006	6	4 inattivazione random	allele 1: 55 ± 17,6 % allele 2: 45 ± 17,6 %	corto
		2 inattivazione <i>skewed</i>	>80%	/
Vorona et al., 2007	101	77 inattivazione random	/	/
		24 inattivazione <i>skewed</i>	inattivazione preferenziale allele 1	corto
Ross et al., 2008	30	26 inattivazione random	/	/
		4 inattivazione <i>skewed</i>	2 compresa tra 80-90 2 > 90%	/
Bojesen et al., 2011	46	34 inattivazione random	allele 1: 0,48% allele 2: 0,52%	lungo
		12 inattivazione <i>skewed</i>	9 > 80% 3 > 90%	/
Ferlin et al., 2011	112	/	allele 1: 53 ± 22,6 % allele 2: 47 ± 22,6 %	corto
Skakkebaek et al., 2014	42	/	allele 1: 51 ± 24 % allele 2: 49 ± 24%	corto
<b>Presente studio</b>	28	22 inattivazione random	allele 1: 48,7 ± 9,4 allele 2: 51,1 ± 9,2	lungo
		6 inattivazione <i>skewed</i>	allele 1: 1 pz > 70%, 1 pz >80% allele 2: 4 pz > 70%	lungo

*Inattivazione allele lungo-* Nei pazienti KS eterozigoti l'inattivazione preferenziale dell'allele lungo è stata identificata dal gruppo di Suzuki nel 2001 il quale ha riscontrato la presenza di 7 KS eterozigoti su 13 totali . Dei 13 eterozigoti 2 mostravano un inattivazione *skewed* maggiore del 90% mentre nei restanti si è osservata un inattivazione random. Anche il gruppo di Zinn nel 2005 hanno identificato un inattivazione preferenziale dell'allele lungo. L'autore ha analizzato 35 KS, 34 puri e 1 mosaico, identificando 13 KS eterozigoti mentre i restanti erano omozigoti. Tra gli eterozigoti solamente 2 KS mostravano un inattivazione *skewed* mentre i restanti avevano un inattivazione random con inattivazione preferenziale dell'allele lungo. Bojesen et al.,2011 hanno studiato 70 KS identificando 46 KS eterozigoti mentre i restanti erano omozigoti. Dei 46 KS eterozigoti 9 mostravano un inattivazione *skewed* maggiore dell'80% e 3 un inattivazione *extreme skewed* in quanto era maggiore del 90% mentre nei restanti KS si osservava un inattivazione random. Nei KS eterozigoti con inattivazione di tipo random c'è una prevalenza di inattivazione dell'allele lungo anche se gli autori riportano che non è presente una differenza statisticamente significativa tra la lunghezza dei CAG nei KS e nei controlli.

*Inattivazione allele corto-* L'inattivazione preferenziale dell'allele corto è stata identificata dal gruppo di Nieschlag nel 2004 e nel 2007. Nel 2004 sono stati studiati 77 Klinefelter identificando 46 KS eterozigoti per il polimorfismo del recettore degli androgeni nei quali è stata evidenziata un inattivazione preferenziale dell'allele corto statisticamente significativo tra i KS e il gruppo di controllo. Successivamente nel 2007 sono stati studiati 101 Klinefelter non mosaico identificando in 24 l'inattivazione *skewed* preferenziale dell'allele corto.

Il gruppo di Wilkstrom nel 2006 ha analizzato 14 KS identificando la presenza di 8 omozigoti. Dei KS 6 eterozigoti 2 KS mostravano un inattivazione *skewed* maggiore dell'80% mentre i restanti hanno mostrato un inattivazione randomica con prevalenza dell'allele corto. La casistica più ampia è stata studiata dal gruppo di Ferlin nel 2011 in quanto ha analizzato 112 KS nei quali è stata osservata un inattivazione preferenziale dell'allele corto pur non essendo significativa la differenza tra i due gruppi. L'inattivazione dell'allele corto è stata identificata anche da Skakkebaek et al.,2014 il quale ha analizzato 73 KS identificando 42 eterozigoti mentre i restanti erano

omozigoti. Negli eterozigoti hanno riscontrato un inattivazione preferenziale dell'allele corto anche se gli autori affermano che non è presente una differenza statisticamente significativa tra la lunghezza dei CAG nei KS e nei controlli.

Per quanto riguarda la metodica di valutazione dell'inattivazione del cromosoma X nei vari lavori non è stata effettuata la stessa metodologia. In tutti i lavori viene utilizzato l'enzima di restrizione HpaII ma ciò che è differente è il tempo di incubazione che varia dalle 6 h (Zinn et al., 2005) all'overnight (Iitsuka et al., 2001; Suzuki et al., 2001; Zitzmann et al., 2004; Wikstrom et al., 2006; Ross et al., 2008; Bojesen et al., 2011; Skakkebaek et al., 2014). Inoltre in alcuni lavori viene effettuato il sequenziamento diretto (Suzuki et al., 2001) mentre in altri viene effettuata l'analisi di frammenti (Iitsuka et al., 2001; Zitzmann et al., 2004; Zinn et al., 2005 ; Wikstrom et al., 2006; Bojesen et al., 2011; Skakkebaek et al., 2014).

Nel mio lavoro non ho identificato correlazioni tra il tratto polimorfico CAG con parametri antropometrici e volumi testicolari. Pur non essendo presenti correlazioni il mio lavoro è il primo che ha valutato la correlazione tra il volume del liquido seminale con la lunghezza dei CAG repeats. I lavori presenti in letteratura hanno identificato una correlazione inversa tra la lunghezza dei CAG repeats e la lunghezza del pene (Zinn et al., 2005), una correlazione positiva tra l'altezza e il numero di ripetizioni ( Zitzmann et al., 2004; Bojesen et al., 2011) e la correlazione positiva con gli ormoni della pubertà ( Wikstrom et al., 2006; Voroma et al., 2007). Non sono state trovate correlazioni tra parametri ormonali ( Skakkebaek et al., 2014) antropometrici, e dell'osso e il numero di ripetizioni dei CAG (Ferlin et al., 2011).

## 10- CONCLUSIONI

La mia ricerca è stata volta ad analizzare vari aspetti molecolari della sindrome di Klinefelter:

Nello studio 1 mi sono occupata di valutare l'incidenza delle microdelezioni del cromosoma Y in pazienti KS rilevando che le delezioni del cromosoma Y non sembrano influenzare gli eventi di non disgiunzione dei cromosomi sessuali paterni e non sembrano causare la perdita dei cromosomi X. Essendo la percentuale delle microdelezioni nei miei pazienti KS più bassa rispetto che nei NOA, si può suggerire che le microdelezioni dell'AZF nei KS non hanno un ruolo genetico nella sindrome.

Nello studio 2 mi sono occupata di valutare la lunghezza dei CAG repeats nei KS evidenziando che i KS sono in ugual numero omozigoti e eterozigoti per gli alleli del recettore degli androgeni e che tra gli eterozigoti si verifica con una frequenza maggiore l'inattivazione di tipo random senza esser presente un inattivazione allelica preferenziale. Peraltro i miei dati non hanno rilevato una correlazione significativa tra parametri antropometrici, seminali, ormonali e volumi testicolari nei pazienti con diversa tipologia di inattivazione (*skewed* vs *random*). Studi successivi relativi all'identificazione di altri fattori molecolari che potrebbero contribuire alla variabilità del fenotipo di questi pazienti saranno importanti al fine di identificare la patogenesi della Sindrome di Klinefelter e identificare target terapeutici per migliorare la prognosi di tale sindrome.

## 11- BIBLIOGRAFIA

- Aksglaede L, Wikström AM, Rajpert-De Meyts E, Dunkel L, Skakkebaek NE, Juul A. Natural history of seminiferous tubule degeneration in Klinefelter syndrome. *Hum Reprod Update* 2006;12:39-48.
- Aksglaede L, Jørgensen N, Skakkebaek NE, Juul A. Low semen volume in 47 adolescents and adults with 47,XXY Klinefelter or 46,XX male syndrome). *Int J Androl* 2009;32:376-84.
- Aksglaede L and Juul A. Testicular function and fertility in men with Klinefelter syndrome: a review. *Eur J Endocrinol* 2013; 168 R67–R76
- Ambasudhan R, Singh K, Agarwal JK, Singh SK, Khanna A, Sah RK, et al. Idiopathic cases of male infertility from a region in India show low incidence of Y-chromosome microdeletion. *J Biosci* 2003; 28:605-12.
- Arruda JT, Bordin BM, Santos PR, Mesquita WE, Silva RC, Maia MC, et al. Y chromosome microdeletions in Brazilian fertility clinic patients. *Genet Mol Res* 2007; 6:461-9.
- Bakircioglu ME, Ulug U, Erden HF, Tosun S, Bayram A, Ciray N, et al. Klinefelter syndrome: does it confer a bad prognosis in treatment of nonobstructive azoospermia? *Fertil Steril* 2011;95:1696-9.
- Balkan M, Tekes S, Gedik A. Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening studies in infertile males with Oligozoospermia and Azoospermia in Southeast Turkey. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25:559-65..
- Behulova R, Varga I, Strhakova L, Bozikova A, Gabrikova D, Boronova I, et al. Incidence of microdeletions in the AZF region of the Y chromosome in Slovak patients with azoospermia. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2011;155:33-8.
- Berletch JB, Yang F, Distech CM. Escape from X inactivation in mice and humans. *Genome Biol.* 2010;11:213. doi: 10.1186/gb-2010-11-6-213. Epub 2010 Jun 24.
- Bogaert V, Vanbillemont G, Taes Y, De Bacquer D, Deschepper E, Van Steen K, Kaufman JM. Small effect of the androgen receptor gene GGN repeat polymorphism on serum testosterone levels in healthy men. *Eur J Endocrinol.* 2009 Jul;161(1):171-7. doi: 10.1530/EJE-09-0123. Epub 2009 Apr 21.

- Bojesen A, Juul S, Gravholt CH. Prenatal and postnatal prevalence of Klinefelter syndrome: a national registry study. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:622-6.
- Bojesen A, Hertz JM, Gravholt CH. Genotype and phenotype in Klinefelter syndrome - impact of androgen receptor polymorphism and *skewed* X inactivation. *Int J Androl*. 2011 Dec;34(6 Pt 2):e642-8. doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01223.x. Epub 2011 Oct 7.
- Bruining H, van Rijn S, Swaab H, Giltay J, Kates W, Kas MJ, van Engeland H, de Sonnevile L. The parent-of-origin of the extra X chromosome may differentially affect psychopathology in Klinefelter syndrome. *Biol Psychiatry*. 2010 Dec 15;68(12):1156-62. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.08.034. Epub 2010 Oct 29.
- Calvo RM, Asunción M, Sancho J, San Millán JL, Escobar-Morreale HF. The role of the CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene and of *skewed* X-chromosome inactivation, in the pathogenesis of hirsutism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(4):1735-40.
- Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*. 2005 17;434:400-4.
- Ceylan C, Ceylan GG, Serel TA. The azoospermia factor locus-c region was found to be related to Klinefelter syndrome in Turkish patients. *Genet Mol Res* 2010; 9:1229-33.
- Chang S, Skakkebaek A, Trolle C, Bojesen A, Hertz JM, Cohen A, Hougaard DM, Wallentin M, Pedersen AD, Østergaard JR, Gravholt CH. Anthropometry in Klinefelter syndrome--multifactorial influences due to CAG length, testosterone treatment and possibly intrauterine hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Mar;100(3):E508-17. doi: 10.1210/jc.2014-2834. Epub 2014 Dec 16.
- Chen HY, Chen WC, Wu MC, Tsai FJ, Tsai CH. Androgen receptor (AR) gene microsatellite polymorphism in postmenopausal women: correlation to bone mineral density and susceptibility to osteoporosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003 Mar 26;107(1):52-6
- Chiang HS, Yeh SD, Wu CC, Huang BC, Tsai HJ, Fang CL. Clinical and pathological correlation of the microdeletion of Y chromosome for the 30 patients with azoospermia and severe oligoasthenospermia. *Asian J Androl* 2004;6:369-75.



- Choe JH, Kim JW, Lee JS, Seo JT. Routine screening for classical azoospermia factor deletions of the Y chromosome in azoospermic patients with Klinefelter syndrome. *Asian J Androl* 2007;9:815-20.
- Chow JC, Yen Z, Ziesche SM, Brown CJ. Silencing of the mammalian X chromosome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2005;6:69-92.
- Colaco S, Modi D. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018; 16:14.
- Corona G, Pizzocaro A, Lanfranco F, Garolla A, Pelliccione F, Vignozzi L, et al. Klinefelter ItaliaN Group (KING). Sperm recovery and ICSI outcomes in Klinefelter syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2017; 23:265-275.
- Dada R, Gupta NP, Kucheria K. AZF microdeletions associated with idiopathic and non-idiopathic cases with cryptorchidism and varicocele. *Asian J Androl* 2002;4:259-63.
- Denschlag D, Tempfer C, Kunze M, Wolff G, Keck C. Assisted reproductive techniques in patients with Klinefelter syndrome: a critical review. *Fertil Steril* 2004;82:775-9.
- Dos Santos Godoy GC, Galera BB, Araujo C, Barbosa JS, de Pinho MF, Galera MF, et al. The Low Prevalence of Y Chromosomal Microdeletions is Observed in the Oligozoospermic Men in the Area of Mato Grosso State and Amazonian Region of Brazilian Patients. *Clin Med Insights Reprod Health* 2014; 8:51-7.
- Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics.* 1992;12(2):241-53.
- Emre Bakircioglu M, Erden HF, Kaplancan T, Ciray N, Bener F, Bahceci M. Aging may adversely affect testicular sperm recovery in patients with Klinefelter syndrome. *Urol* 2006; 68:1082-6.
- Ferlin A, Tessari A, Ganz F, Marchina E, Barlati S, Garolla A, et al. Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. *J Med Genet* 2005;42:209-13.

- Ferlin A, Arredi B, Speltra E, Cazzadore C, Selice R, Garolla A, et al. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 ;92:762-70.
- Ferrás C, Fernandes S, Marques CJ, Carvalho F, Alves C, Silva J, et al. AZF and DAZ gene copy-specific deletion analysis in maturation arrest and Sertoli cell-only syndrome. *Mol Hum Reprod* 2004;10:755-61.
- Foresta C, Ferlin A, Garolla A, Moro E, Pistorello M, Barboux S, et al. High frequency of well-defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome. *Hum Reprod* 1998;13:302-7.
- Foresta C, Ferlin A, Moro E, Marin P, Rossi A, Scandellari C. Microdeletion of chromosome Y in male infertility: role of the DAZ gene. *Ann Ital Med Int* 2001;16:82-92.
- Francomano D, Greco EA, Lenzi A, Aversa A. CAG repeat testing of androgen receptor polymorphism: is this necessary for the best clinical management of hypogonadism? *J Sex Med.* 2013;10(10):2373-81. doi: 10.1111/jsm.12268.
- Freije D, Helms C, Watson MS, Donis-Keller H. Identification of a second pseudoautosomal region near the Xq and Yq telomeres. *Science* 1992; 258:1784-7.
- Giovannucci E, Platz EA, Stampfer MJ, Chan A, Krithivas K, Kawachi I, Willett WC, Kantoff PW. The CAG repeat within the androgen receptor gene and benign prostatic hyperplasia. *Urology.* 1999 Jan;53(1):121-5.
- Hadjkacem-Loukil L, Ghorbel M, Bahloul A, Ayadi H, Ammar-Keskes L. Genetic association between AZF region polymorphism and Klinefelter syndrome. *Reprod Biomed Online* 2009;19:547-51.
- Härkönen K, Huhtaniemi I, Mäkinen J, Hübler D, Irjala K, Koskenvuo M, Oettel M, Raitakari O, Saad F, Pöllänen P. The polymorphic androgen receptor gene CAG repeat, pituitary-testicular function and andropausal symptoms in ageing men. *Int J Androl.* 2003 Jun;26(3):187-94.
- Helena Mangs A, Morris BJ. The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future. *Curr Genomics* 2007;8:129-36.
- Ichioka K, Utsunomiya N, Kohei N, Ueda N, Inoue K, Terai A. Adult onset of declining spermatogenesis in a man with nonmosaic Klinefelter's syndrome. *Fertil Steril* 2006; 85:1511.

- Iitsuka Y, Bock A, Nguyen DD, Samango-Sprouse CA, Simpson JL, Bischoff FZ. Evidence of *skewed* X-chromosome inactivation in 47,XXY and 48,XXYY Klinefelter patients. *Am J Med Genet*. 2001;981:25-31.
- Jacobs PA, Hassold TJ, Whittington E, Butler G, Collyer S, Keston M, Lee M. Klinefelter's syndrome: an analysis of the origin of the additional sex chromosome using molecular probes. *Ann Hum Genet*. 1988 May;52(Pt 2):93-109.
- Jørgensen IN, Skakkebaek A, Andersen NH, Pedersen LN, Hougaard DM, Bojesen A, Trolle C, Gravholt CH. Short QTc interval in males with klinefelter syndrome- influence of CAG repeat length, body composition, and testosterone replacement therapy. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2015 Apr;38(4):472-82. doi: 10.1111/pace.12580. Epub 2015 Jan 23.
- Komori S, Kato H, Kobayashi S, Koyama K, Isojima S. Transmission of Y chromosomal microdeletions from father to son through intracytoplasmic sperm injection. *J Hum Genet*. 2002;47:465-8.
- Krausz C, Forti G. Sperm cryopreservation in male infertility due to genetic disorders. *Cell Tissue Bank*. 2006; 7:105-12.
- Lahlou N, Fennoy I, Carel JC, Roger M. Inhibin B and anti-Müllerian hormone, but not testosterone levels, are normal in infants with nonmosaic Klinefelter syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(4):1864-8.
- Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E. Klinefelter's syndrome. *Lancet* 2004; 364:273-83.
- Lee YH, Kim T, Kim MH, Kim YT, Kim SH. Y chromosome microdeletions in idiopathic azoospermia and non-mosaic type of Klinefelter syndrome. *Exp Mol Med* 2000; 32:231-4.
- Li Z, Haines CJ, Han Y. "Micro-deletions" of the human Y chromosome and their relationship with male infertility. *J Genet Genomics* 2008;35:193-9.
- Li LX, Dai HY, Ding XP, Zhang YP, Zhang XH, Ren HY, et al. Investigation of AZF microdeletions in patients with Klinefelter syndrome. *Genet Mol Res* 2015; 14:15140-7.
- Lin YM, Huang WJ, Lin JS, Kuo PL. Progressive depletion of germ cells in a man with nonmosaic Klinefelter's syndrome: optimal time for sperm recovery. *Urol* 2004;63:380-1

- LYON MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*. 1961 Apr 22;190:372-3.
- MacLean HE, Warne GL, Zajac JD. Defects of androgen receptor function: from sex reversal to motor neurone disease. *Mol Cell Endocrinol*. 1995 Aug 11;112(2):133-41. Review.
- Madureira C, Cunha M, Sousa M, Neto AP, Pinho MJ, Viana P, et al. Treatment by testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection of 65 azoospermic patients with non-mosaic Klinefelter syndrome with birth of 17 healthy children. *Androl* 2014;2:623-31.
- Maiburg M, Repping S, Giltay J. The genetic origin of Klinefelter syndrome and its effect on spermatogenesis. *Fertil Steril* 2012;98:253-60
- Mitra A, Dada R, Kumar R, Gupta NP, Kucheria K, Gupta SK. Y chromosome microdeletions in azoospermic patients with Klinefelter's syndrome. *Asian J Androl* 2006; 8:81-8.
- Mohammed F, Al-Yatama F, Al-Bader M, Tayel SM, Gouda S, Naguib KK. Primary male infertility in Kuwait: a cytogenetic and molecular study of 289 infertile Kuwaiti patients. *Andrologia* 2007;39:87-92.
- Ntais C, Polycarpou A, Tsatsoulis A. Molecular epidemiology of prostate cancer: androgens and polymorphisms in androgen-related genes. *Eur J Endocrinol*. 2003 Dec;149(6):469-77. Review.
- Okada H, Goda K, Yamamoto Y, Sofikitis N, Miyagawa I, Mio Y, et al. Age as a limiting factor for successful sperm retrieval in patients with nonmosaic Klinefelter's syndrome. *Fertil Steril* 2005;84:1662-4.
- Oliva R, Margarit E, Ballescà JL, Carrió A, Sánchez A, Milà M, et al. Prevalence of Y chromosome microdeletions in oligospermic and azoospermic candidates for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998;70:506-10.
- Peterlin B, Kunej T, Sinkovec J, Gligorievska N, Zorn B. Screening for Y chromosome microdeletions in 226 Slovenian subfertile men. *Hum Reprod* 2002;17:17-24.
- Pina-Neto JM, Carrara RC, Bisinella R, Mazzucatto LF, Martins MD, Sartoratto E, et al. Somatic cytogenetic and azoospermia factor gene microdeletion studies in infertile men. *Braz J Med Biol Res* 2006;39:555-61.

- Plaseski T, Noveski P, Trivodalieva S, Efremov GD, Plaseska-Karanfilska D. Quantitative fluorescent-PCR detection of sex chromosome aneuploidies and AZF deletions/duplications. *Genet Test* 2008;12:595-605.
- Rajpert-De Meyts E, Ottesen AM, Garn ID, Aksglaede L, Juul A. Deletions of the Y chromosome are associated with sex chromosome aneuploidy but not with Klinefelter syndrome. *Acta Paediatr* 2011; 100:900-2.
- Rappold GA. The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Hum Genet* 1993;92:315-24.
- Ross JL, Roeltgen DP, Stefanatos G, Benecke R, Zeger MP, Kushner H, Ramos P, Elder FF, Zinn AR. Cognitive and motor development during childhood in boys with Klinefelter syndrome. *Am J Med Genet A*. 2008 Mar 15;146A(6):708-19. doi: 10.1002/ajmg.a.32232.
- Seidman SN, Araujo AB, Roose SP, McKinlay JB. Testosterone level, androgen receptor polymorphism, and depressive symptoms in middle-aged men. *Biol Psychiatry*. 2001 Sep 1;50(5):371-6.
- Sills ES, Sholes TE, Perloe M, Kaplan CR, Davis JG, Tucker MJ. Characterization of a novel receptor mutation A-->T at exon 4 in complete androgen insensitivity syndrome and a carrier sibling via bidirectional polymorphism sequence analysis. *Int J Mol Med*. 2002;9(1):45-8.
- Simoni M, Tüttelmann F, Gromoll J, Nieschlag E. Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: the extended Münster experience. *Reprod Biomed Online* 2008;16:289-303.
- Skakkebaek A, Bojesen A, Kristensen MK, Cohen A, Hougaard DM, Hertz JM, Fedder J, Laurberg P, Wallentin M, Østergaard JR, Pedersen AD, Gravholt CH. Neuropsychology and brain morphology in Klinefelter syndrome - the impact of genetics. *Andrology*. 2014 Jul;2(4):632-40. doi: 10.1111/j.2047-2927.2014.00229.x. Epub 2014 May 28.
- Staessen C, Tournaye H, Van Assche E, Michiels A, Van Landuyt L, Devroey P, et al. PGD in 47,XXY Klinefelter's syndrome patients. *Hum Reprod Update* 2003;9:319-30
- Stemkens D, Roza T, Verrij L, Swaab H, van Werkhoven MK, Alizadeh BZ, Sinke RJ, Giltay JC. Is there an influence of X-chromosomal imprinting on the phenotype in

Klinefelter syndrome? A clinical and molecular genetic study of 61 cases. *Clin Genet*. 2006 Jul;70(1):43-8.

- Suzuki Y, Sasagawa I, Tateno T, Ashida J, Nakada T, Muroya K, Ogata T. Mutation screening and CAG repeat length analysis of the androgen receptor gene in Klinefelter's syndrome patients with and without spermatogenesis. *Hum Reprod*. 2001 Aug;16(8):1653-6.
- Tateno T, Sasagawa I, Ichiyanagi O, Ashida J, Nakada T, Saito H, et al. Microdeletion of the DAZ (deleted in azoospermia) gene or the YRRM (Y chromosome ribonucleic acid recognition motif) gene does not occur in patients with Klinefelter's syndrome with and without spermatogenesis. *Fertil Steril* 1999;71:746-9.
- Thangaraj K, Gupta NJ, Pavani K, Reddy AG, Subramanian S, Rani DS, et al. Y chromosome deletions in azoospermic men in India. *J Androl* 2003;24:588-97.
- Thomas NS, Collins AR, Hassold TJ, Jacobs PA. A reinvestigation of non-disjunction resulting in 47, XXY males of paternal origin. *Eur J Hum Genet* 2000;8:805-8.
- Thomas NS, Hassold TJ. Aberrant recombination and the origin of Klinefelter syndrome. *Hum Reprod Update* 2003; 9:309-17.
- Tirabassi G, Delli Muti N, Corona G, Maggi M, Balercia G. Androgen Receptor Gene CAG Repeat Polymorphism Regulates the Metabolic Effects of Testosterone Replacement Therapy in Male Postsurgical Hypogonadotropic Hypogonadism. *Int J Endocrinol*; 2013:816740. doi: 10.1155/2013/816740
- Tirabassi G, Cignarelli A, Perrini S, Delli Muti N, Furlani G, Gallo M, Pallotti F, Paoli D, Giorgino F, Lombardo F, Gandini L, Lenzi A, Balercia G. Influence of CAG Repeat Polymorphism on the Targets of Testosterone Action. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:298107. doi: 10.1155/2015/298107. Epub 2015 Sep 2.
- Tüttelmann F1, Gromoll J. Novel genetic aspects of Klinefelter's syndrome. *Mol Hum Reprod*. 2010 Jun;16(6):386-95. doi: 10.1093/molehr/gaq019. Epub 2010 Mar 12.
- Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, et al. Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod* 1996;11 Suppl 4:1-24; discussion 25-6.
- van der Ven K, Montag M, Peschka B, Leygraaf J, Schwanitz G, Haidl G, et al. Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Mol Hum Reprod* 1997;3:699-704.

- Vincent MC, Daudin M, De MP, Massat G, Mieusset R, Pontonnier F, et al. Cytogenetic investigations of infertile men with low sperm counts: a 25-year experience. *J Androl* 2002; 23:18-22; discussion 44-5.
- von Eckardstein S, Syska A, Gromoll J, Kamischke A, Simoni M, Nieschlag E. Inverse correlation between sperm concentration and number of androgen receptor CAG repeats in normal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jun;86(6):2585-90.
- Vorona E1, Zitzmann M, Gromoll J, Schüring AN, Nieschlag E. Clinical, endocrinological, and epigenetic features of the 46,XX male syndrome, compared with 47,XXY Klinefelter patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Sep;92(9):3458-65. Epub 2007 Jun 19.
- Vottero A, Stratakis CA, Ghizzoni L, Longui CA, Karl M, Chrousos GP. Androgen receptor-mediated hypersensitivity to androgens in women with nonhyperandrogenic hirsutism: skewing of X-chromosome inactivation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(3):1091-5.
- Wang RX, Fu C, Yang YP, Han RR, Dong Y, Dai RL, et al. Male infertility in China: laboratory finding for AZF microdeletions and chromosomal abnormalities in infertile men from Northeastern China. *J Assist Reprod Genet* 2010;27:391-6.
- Wikström AM, Raivio T, Hadziselimovic F, Wikström S, Tuuri T, Dunkel L. Klinefelter syndrome in adolescence: onset of puberty is associated with accelerated germ cell depletion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(5):2263-70.
- Wikström AM, Painter JN, Raivio T, Aittomäki K, Dunkel L. Genetic features of the X chromosome affect pubertal development and testicular degeneration in adolescent boys with Klinefelter syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006 Jul;65(1):92-7.
- World Health Organisation. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th Edn. Geneve, Switzerland. 2010.
- Yoshioka M, Yorifuji T, Mituyoshi I. *Skewed X inactivation* in manifesting carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Clin Genet.* 1998;53(2):102-7.
- Zeger MP, Zinn AR, Lahlou N, Ramos P, Kowal K, Samango-Sprouse C, Ross JL. Effect of ascertainment and genetic features on the phenotype of Klinefelter syndrome. *J Pediatr.* 2008 May;152(5):716-22. doi: 10.1016/j.jpeds.2007.10.019. Epub 2007 Dec 21.

- Zhang F, Lu C, Li Z, Xie P, Xia Y, Zhu X, et al. Partial deletions are associated with an increased risk of complete deletion in AZFc: a new insight into the role of partial AZFc deletions in male infertility. *J Med Genet* 2007;44:437–444.
- Zhang HG, Zhang ZB, Wang RX, Yu Y, Yu XW, Fadlalla E, et al. Male infertility in Northeast China: molecular detection of Y chromosome microdeletions in azoospermic patients with Klinefelter's syndrome. *Genet Mol Res* 2013; 12:4972-80.
- Zinn AR, Ramos P, Elder FF, Kowal K, Samango-Sprouse C, Ross JL. Androgen receptor CAGn repeat length influences phenotype of 47,XXY (Klinefelter) syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(9):5041-6. Epub 2005 Jun 14.
- Zitzmann M, Brune M, Kornmann B, Gromoll J, Junker R, Nieschlag E. The CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene affects bone density and bone metabolism in healthy males. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2001 Nov;55(5):649-57
- Zitzmann M, Gromoll J, von Eckardstein A, Nieschlag E. The CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene modulates body fat mass and serum concentrations of leptin and insulin in men. *Diabetologia.* 2003 Jan;46(1):31-9. Epub 2002 Dec 20.
- Zitzmann M, Depenbusch M, Gromoll J, Nieschlag E. X-chromosome inactivation patterns and androgen receptor functionality influence phenotype and social characteristics as well as pharmacogenetics of testosterone therapy in Klinefelter patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Dec;89(12):6208-17.